

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

HARNSTOFF ALS ADJUVANS
BEI DER ORALEN IMMUNISIERUNG
MIT INAKTIVIERTEN BAKTERIEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Brachlow

aus Freiheit/Krs. Osterode

1977

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Harnstoff als Adjuvans bei der oralen Immunisierung
mit inaktivierten Bakterien



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Michael Brachlow
aus Freiheit/Krs. Osterode

Referent: Professor Dr. H. RAETTIG

Koreferent: Professor Dr. Dr. K.H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE



Gedruckt mit Genehmigung des Medizinischen Fachbereichs der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. Februar 1977

MEINER MUTTER GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	
1. Fragestellung	5
2. Geschichte der oralen Immunisierung	5
3. Harnstoff	10
II. MATERIAL UND METHODEN	
1. Versuchstiere	13
2. Impfstoffe	13
3. Immunisierung	14
4. Infektion	15
5. Ergebnisse und deren Bewertung	15
III. VERSUCHSERGEBNISSE	
1. Vorversuche mit <i>Escherichia coli</i> 2380	16
2. Hauptversuche mit <i>Escherichia coli</i> 2380	18
3. Versuche mit <i>Salmonella enteritidis</i> jena 317	19
IV. DISKUSSION	27
V. ZUSAMMENFASSUNG	28
VI. LITERATURVERZEICHNIS	30

I. EINLEITUNG

1. Fragestellung

Das Thema dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Harnstoff als Adjuvans in der Lage ist, die Wirkung einer oralen Immunisierung zu erhöhen, sei es durch Steigerung der Resorptionsquote des Antigens durch die Darmschleimhaut oder aber durch Verbesserung der immunogenetischen Eigenschaften des Impfstoffes.

2. Geschichte der oralen Immunisierung

Die prophylaktische Immunisierung gegen bestimmte Krankheiten des Menschen ist bei einigen Völkern eine schon lang bekannte Tatsache. Der im Altertum lebende König Mithridates von Pontus zum Beispiel suchte sich durch prophylaktische Einnahme von untertödlichen Dosen giftiger Pilze vor möglichen Vergiftungsversuchen zu schützen (10). Die Siamesen, Inder und Chinesen brachten seit Menschengedenken während Pockenepidemien Pustelinhalt in Nase und artifizielle Hautabschürfungen ein; Gleichlautendes wird aus dem Europa des Mittelalters berichtet. Die Vatusas von der Ostküste Afrikas bestreichen seit langem als Prophylaxe gegen Schlangenbisse künstlich gesetzte Hautwunden an Armen und Beinen mit einer Paste, die das spezifische Gift enthält (1). Die Tatsache also, daß eine überstandene Krankheit vor einer erneuten Infektion schützt, oder daß steter Kontakt zu tödlichen Giften

eine gewisse Gewöhnung an diese bewirkt, wurde instinktiv richtig gedeutet und führte so zu den ersten prophylaktischen Immunisierungen.

Die wissenschaftliche Immunitätsforschung beginnt mit LOUIS PASTEUR, der erstmals Immunisierungsversuche durchführte. 1880 veröffentlichten PASTEUR, CHAMBERLAND und ROUX ihre Versuchsergebnisse über die Fütterung von Hühnern mit den Erregern der Hühnercholera. Die oral infizierten Hühner, welche am Leben blieben, erwiesen sich nach überstandener Infektion als immun gegen weitere Infektionen (22). EHRLICH (9) gelang 1891 bei Tieren die orale Immunisierung gegen pflanzliche Gifte. Er verfütterte Ricin und Abrin in steigenden Dosen an Mäuse und Kaninchen und erhöhte damit die letale Dosis dieser Gifte. 1894 konnte SABOLOTNY nachweisen, daß man das sehr empfängliche Ziesel durch orale Immunisierung mit hitzeabgetöteten Kulturen besser gegen Cholera schützen kann, als mit anderen Immunisierungsmethoden (32). RÖMERS (39) und VON DUNGERS (8) Untersuchungen über lokale Immunität am Auge veranlaßten WASSERMANN und CITRON 1905 zu experimentellen Untersuchungen dieses Problems bei Typhus. Ergebnis dieser Untersuchungen ist die Feststellung, daß es für Bakterien, die eine bestimmte Eingangspforte besitzen (Magen-Darmkanal), das Beste und Sicherste wäre, eine lokale Immunität an dieser Eingangspforte zu erzielen (51).

1906 wies LOEFFLER (25) erstmals nach, daß man Mäuse durch orale Immunisierung vor einer tödlichen Infektion mit *Salmonella typhi murium* schützen kann. Die gleichzeitig parallel durchgeführten subkutanen und intraperitonealen Darreichung von hitze-

inaktivierten *S. typhi* murium Bakterien erwiesen sich als nicht erfolgreich. Schon 1908 führte SHIGA nach umfangreichen Versuchen an Kaninchen erstmals orale Immunisierungen am Menschen gegen Dysenterie durch (42). Obwohl die Ergebnisse erfolgversprechend waren, bleiben sie unbeachtet. METSCHNIKOFF und BESREDKA machten 1911 Impfversuche per os gegen Typhus an Affen. SAWTSCHENKO und ZABOLOTNY testeten die orale Immunisierung gegen Cholera an sich selber (23).

Die Diskussionen über die orale Immunisierung beginnen erst wieder nach dem ersten Weltkrieg, angeregt durch BESREDKA, Mitarbeiter METSCHNIKOFFs und energischer Vertreter der lokalen Immunitätstheorie. In den Jahren von 1921 bis 1930 wurden hauptsächlich im Ausland umfangreiche Versuche unternommen, um die orale Typhusimmunisierung in der praktischen Epidemiologie zu erproben (33). Die Versuchsergebnisse zeigen übereinstimmend eine beträchtliche Senkung der Typhusmorbidität bei geimpften Personen. Trotz eindeutiger Erfolge der oralen Immunisierung setzte sich die parenterale Immunisierung immer mehr durch, nicht zuletzt deswegen, weil nach der parenteralen Immunisierung ein meßbarer Antikörpertiter ein Ausdruck für die Belastbarkeit der Immunität zu sein schien. Auch konnte diese humorale Immunität mit Hilfe der EHRLICHschen Seitenkettentheorie theoretisch untermauert werden, während es BESREDKA an einer ausreichend überzeugenden Theorie mangelte.

Von 1945 bis 1948 führten RAETTIG und Mitarbeiter zunächst parenterale Immunisierungen gegen Typhus im Lande Mecklenburg durch, die aber nicht den gewünschten Erfolg zeigten. RAETTIG entschloß sich zur Durchführung einer oralen Immunisierung im

Sommer 1948, die eine erstaunliche Senkung der Morbidität nach sich zog (33). Die Bedeutung der oralen Immunisierung bzw. der lokalen Immunität wurde von ihm erkannt, und er arbeitet bis heute maßgeblich auf diesem Gebiet.

Solange auf dem Gebiet der oralen Immunisierung gearbeitet wurde, ist auch versucht worden, Persorption und Wirksamkeit des Antigens mit Hilfe von Adjuvantien zu verbessern. 1909 berichten MC CLINTOCK, CHARLES und KING (10) über Versuche, die Antigenverluste im Magen-Darmkanal durch vorherige Verabreichung von Natriumbikarbonat, von Opium oder von in Chloroform gelösten Salol zu verringern. HIDA und TOYODA (17), LUMIERE und CHEVROTIER (26) füllten abgetötete Bakterien in Keratinkapseln, um sie vor der Einwirkung der Verdauungssäfte zu schützen. BESREDKA (2) führte 1918 die Rindergalle als Adjuvans in die orale Immunisierung ein. Diesem Schritt lag die Beobachtung zugrunde, daß günstige Impfergebnisse nur bei der Verfütterung von lebenden Bakterien erzielt werden konnten, die die Fähigkeit besaßen, aktiv die Schleimschicht und das Schleimhautepithel des Darmes zu durchdringen oder die auch im abgetöteten Zustand zumindest ein oberflächenaktives Endotoxin besitzen, das in der Lage ist, den epithelschützenden Schleim zu entfernen, welcher Antigen und zu immunisierende Zelle voneinander trennt. Die zeitweilig nicht eindeutigen Erfolge der damaligen oralen Immunisierungsversuche gegen Typhus und Cholera erklärte er durch die Nichtresorption der Bakterien bei intaktem Darmwandepithel, die Erfolge bei der Ruhrimmunisierung per os durch das oberflächenaktive Endotoxin der Shigellen. Folglich mußte man den beiden anderen Impfstoffen ein Adjuvans hinzusetzen, nämlich Rindergalle. Bei Vorbehandlung der Versuchstiere zwecks "Reinigung der Epitheldecke"

ließ sich oral leicht ein ausreichender Impfschutz erzielen. In der Folgezeit berichten viele –meist ausländische Autoren– über orale Impferfolge beim Menschen, die in Typhusepidemiegebieten durchgeführt wurden (5, 31, 44). Parallel durchgeführte subkutane Impfungen erwiesen sich als weniger wirksam (47). Wegen der sich nach Umrechnung vom Tierversuch auf den Menschen ergebenden Gallemenge (22, 23), die vor jeder oralen Immunisierung eingenommen werden mußte, und wegen unkontrollierbarer Nebenerscheinungen bei Tierversuchen, lehnten andere Autoren die Gallevorbehandlung ab (19, 27).

Neben der Galle wurden auch die verschiedenen Gallensalze auf ihre Verwendbarkeit als Adjuvans geprüft (7). Mit der Entdeckung der hydrotrophischen Substanzen durch NEUBERG fand das Natrium-benzoikum Verwendung und wurde dem von WASSERMANN und NEUBERG geschaffenen Typhus-"Immunoidimpfstoff" hinzugefügt (37). FRÄNKEL und SCHULZ sowie REITER und KUOWA (11, 38) können die Wirksamkeit dieses Adjuvans bestätigen, berichten aber bei Überdosierung von Coli-Autoinfektionen der Versuchstiere bzw. von evtl. Zerstörung der immunogenetischen Eigenschaften des Impfstoffes. Trotzdem findet der Immunoidimpfstoff verbreitete Anwendung. FRÄNKEL (10) berichtet 1927 über die erfolgreiche Immunisierung von Schulkindern während einer Typhusepidemie, HIRSCH (18) bestätigt FRÄNKELs Erfolge mit eigenen Impfergebnissen aus Jugoslawien, wo in den Jahren 1924 bis 1927 ungefähr 120 000 Menschen mit Immunoidimpfstoffen erfolgreich oral immunisiert wurden.

Die Suche nach Substanzen, die die Wirksamkeit oraler Impfstoffe verbessern sollen, ist auch heute nicht abgeschlossen. Trotz

einiger Erfolge ist das "Idealadjuvans" noch nicht gefunden. RAETTIG und Mitarbeiter haben an dem von ihm entwickelten Infektionsmodell weitere Substanzen auf ihre Eignung als Adjuvans untersucht (36). So wurde die Aristolochiasäure (Tardolyt), welche die Phagozytoserate erhöht, mit dem Antigen gemischt in der Erwartung, daß die Immunogenität aufgrund der erhofft verstärkten Resorption des Antigens erhöht wird (34). Diese Hoffnungen haben sich nicht bestätigt. Weiterhin wurde das Dimethylsulfoxyd (DMSO) verwendet (41), das die Durchlässigkeit von Haut und Schleimhäuten erhöht. Auch hier lag der Gedanke nahe, daß ein Zusatz von DMSO die Resorption des Antigens im Darm verstärken könnte. Hier zeigten sich ebenfalls keine Erfolge, weil das DMSO, wie man herausfand, das Antigen bereits bei der Mischung zerstört. Zeitlich getrennte Gaben von DMSO und Antigenen blieben auch erfolglos (35). Die orale Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freundschens Adjuvans führte zu keiner Steigerung der Wirksamkeit (14).

Die Frage, ob nun Harnstoff in der Lage ist, die Wirksamkeit oder die Resorption des Antigens zu steigern, wurde von mir an Hand des RAETTIGschen Infektionsmodells geprüft.

3. Harnstoff

Harnstoff, auch Carbamid, Carbonyldiamid, Carbaminsäurediamid oder Kohlensäurediamid genannt, liegt bei Zimmertemperatur in Form von farblosen und geruchsfreien Kristallen vor. Es wird großtechnisch durch Erhitzen eines Gemisches von Ammoniak und

Kohlendioxid im Hochdruckreaktor hergestellt. Der Mensch scheidet 80 bis 90 % des aufgenommenen Eiweißstickstoffes in Form von Harnstoff aus; Harnstoff ist die bei weitem wichtigste Stickstoffverbindung des Säugetierharnes (40).

In vielen Bereichen des täglichen Lebens wird Harnstoff als Zusatz- oder Ausgangsprodukt für die Herstellung von Gebrauchsgütern verwendet: im Trockenlöschpulver, als Saatschutzmittel, in Klebstoffen, in großen Mengen im Stickstoffdünger, zum Unbrennbarmachen von Kunststoffen, zur Druckfarbenherstellung von Offsetdrucken, als eiweißaufbauender Futterzusatz bei Wiederkäuern, bei pharmazeutischen Präparaten (Hydrazin, Barbiturate) und kosmetischen Präparaten.

Aus der Physiologie und der physiologischen Chemie, sowie aus der Pharmakologie liegt umfangreiches Material vor, in dem mit Harnstoff experimentiert wurde. So wird von Enzymaktivitätsänderungen unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen berichtet: MAXWELL (28) schreibt von einer Aktivierung der steroidempfindlichen Aldehyddehydrogenase durch niedrige Harnstoffkonzentrationen, BRAHMS und KAY (4) von einer Beeinflussung der Adenosintriphosphataseaktivitäten: Harnstoff wirkt aktivierend in kleinen Konzentrationen, in größeren hemmend. GIORDANO, BLOOM und MERBEL (12) berichten über die Hemmung der Monoaminoxidaseaktivität im Kaninchengewebe. NELSON und HUMMEL (30) konnten eine reversible Denaturierung von Pankreasribonuclease durch Harnstoff beobachten. Die Plasmacholinesterase kann nach JENSEN-HOHN (20) durch Harnstoff als reversiblen Inhibitor in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Weiterhin wird über die Eigenschaft von 4 bis 8 m Harnstoff berichtet, in Kollagen Wasserstoffbrücken zu spalten (15). BINAGHI, HALPERN, LIACOPOULOS und NEVU (3)

stellten fest, daß mit Kaninchen-Antiovalbuminantikörper in vitro passiv sensibilisierte Streifen von Meerschweinchenileum in Tyrode-Lösung nach Zugabe des Antigens (Hühnerovalbumin) kontrahieren. Nach Zusatz von Harnstoff zur Kaninchen-anti-ovalbuminantikörperhaltigen Tyrode-Lösung wird jedoch der Prozeß der Sensibilisierung des Intestinums signifikant gesteigert. Diese Wirkung machte sich schon bei einer Konzentration von 0,16 m Harnstoff bemerkbar und wurde bei einer Konzentration von 0,8 m weiterhin ausgeprägt.

CUPAVENCU, GROSU und BIRSAN (6) berichten von einer Hemmung der spontanen Motilität des isolierten Rattenduo-*duodenum*s und -*ileums*, verbunden mit einer starken Tonussteigerung unter dem Einfluß von 15 bis 25%igem Harnstoffzusatz. In dieser Arbeit wurde auch auf die sensibilisierende Wirkung des Harnstoffes hingewiesen: Harnstoff sensibilisiert dosisabhängig das Rattenileum gegen den Einfluß von Histamin und Serotonin. Schwer lösliche Arzneimittel können im Gemisch mit gut löslichen Verbindungen besser in Lösung gebracht werden und gastrointestinal besser absorbiert werden, z.B.: Sulfatiazol/Harnstoff, Chloramphenicol/Harnstoff (13, 53), Natriumgluconatisonicotinylhydrazon/Harnstoff (43).

Aus der Botanik wird berichtet, daß Harnstoff die Permeation von Ionen durch die isolierte Cuticularmembran auf das Dreifache beschleunigen kann (52).

Betrachtet man nun einige der oben genannten Eigenschaften des Harnstoffes, so wäre es durchaus möglich, daß er die Persorption des Antigens aus dem Magen-Darmkanal positiv beeinflussen könnte.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Es wurden für die Versuche sowohl NMRI (Naval Medical Research Institute) -Mäuse beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Bundesgesundheitsamtes Berlin verwendet, als auch die hauseigenen "Falben", eine Kreuzung aus der grauen Feldmaus und der weißen NMRI-Maus. Die Tiere waren nach Geschlechtern getrennt in Plastikkäfigen zu jeweils 25 Tieren untergebracht und wogen zu Versuchsbeginn im Durchschnitt 15 Gramm. Die Ernährung bestand aus Altromin und Leitungswasser. In Zwischenversuchen fanden weiterhin schwarze C 57-Mäuse Verwendung. Insgesamt wurden über 3.000 Mäuse gebraucht.

2. Impfstoffe

In den beiden parallel laufenden Versuchsreihen wurde einmal der *E.coli* 2380, zum anderen *S.enteritidis* jena 317 als spezifisches Antigen verwendet. Zur Impfstoffherstellung wurde eine Öse des jeweiligen Stammes in Bouillon gegeben und sechs Stunden bei 37 ° C bebrütet. Anschließend wurden je 5 ml der Bouillon entnommen und auf große Agarschalen verteilt. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 ° C wurden die Bakterienrasen mit dem vorhandenen Kondenzwasser abgeschwemmt und eine Stunde lang bei 6000 U/min zentrifugiert. Die im Bodensatz befindlichen Bakterien wurden zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung

(pH 7,4) gewaschen. Zur Bestimmung der Keimzahl wurde eine Zählung angesetzt; meist ergaben sich etwa 10^{11} Keime/ml. Die Inaktivierung der Bakterien erfolgte in Thermostaten bei 100°C 3 min lang. Zur Sterilitätskontrolle werden 0,1 ml in 200 ml Bouillon gegeben und 24 Stunden beobachtet. Der Titer des benötigten Impfstoffes wurde nun durch entsprechendes Verdünnen der Ausgangssuspension mit physiologischer Kochsalzlösung eingestellt und lag bei *S. enteritidis* jena 317 zwischen $1,5 \times 10^9$ und 3×10^9 Keimen /ml. Für den *E. coli* 2380 mußten niedrigere Dosen verwendet werden. Die Begründung erfolgt bei der Besprechung der Versuche.

3. Immunisierung

Die Gesamtdosis des Impfstoffes für eine vollständige orale Immunisierung liegt bei ungefähr 10^9 Keimen. Sie wird in zehn Einzeldosen geteilt und den Tieren an 2 x 5 Tagen hintereinander mit einer zweitägigen Pause am Wochenende verabreicht. Die zweitägige Pause hat auf den Wirkungsindex keinen nennenswerten Einfluß, so daß die arbeitstechnisch unbequeme, an zehn aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführte Immunisierung aufgegeben werden konnte. 0,25 ml des Impfstoffes wurde den Mäusen, nach obengenanntem Impfrhythmus, mittels einer stumpfen, abgebogenen Knopfkanüle verabreicht. Die Kontrolltiere blieben dagegen unbehandelt. Zeichen einer Unverträglichkeit dieser Immunisierungsmethode konnten während der ganzen Immunisierungsperiode nicht beobachtet werden.

4. Infektion

Der zehnte Tag nach der letzten oralen Impfstoffabgabe war der Infektionstag. Alle Tiere, sowohl die immunisierten als auch die Kontrolltiere wurden jeweils mit dem virulenten Stamm von *E.coli* 2380 bzw. *S.enteritidis* jena 317 intraperitoneal infiziert, wobei 0,1 ml einer 6-Stunden-Bouillon des betreffenden Keimes mittels Tuberkulinspritze verabreicht wurde. Die Keimzahl des Infektionsmaterials betrug bei *E.coli* 2380 zwischen 4×10^8 und $7,8 \times 10^8$ Keime/ml, bei *S.enteritidis* jena 317 um 4×10^8 Keime/ml. Bei *S.enteritidis* jena 317 wurde das Infektionsmaterial kurz vor der Verwendung noch einmal mit Bouillon 1 : 100 verdünnt, da wir in Zwischenversuchen dies als die optimale Infektionskonzentration erkannten.

5. Ergebnisse und deren Bewertung

Die von mir durchgeführten Versuche waren Mortalitätsversuche, d.h. die Wirksamkeit des Adjuvans wurde an der Senkung der Mortalität gegenüber einer negativen Kontrollgruppe gemessen. Zur graphischen Darstellung und Auswertung der Versuche wurde die Mortalitätskurve und der Wirkungsindex verwendet.

Die Mortalität zeigt an, wieviel Prozent der Tiere in den jeweiligen Tagen post infectionem gestorben sind.

Der Wirkungsindex wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{(b-a) \times 100}{b} .$$

Es bedeuten: W = Wirkungsindex, a = Endmortalität der geimpften Tiere, b = Endmortalität der negativen Kontrollgruppe.

Die statistische Sicherung der Ergebnisse wurde nach KOLLER (24) durchgeführt, wobei sich die Echtheit E der Versuchsergebnisdifferenzen aus der beobachteten Differenz D_b und der größten zugelassenen Zufallsdifferenz D_z ergibt:

$$E = \frac{D_b}{D_z} \quad .$$

Ist E größer als 1, so kann das Ergebnis als statistisch gesichert betrachtet werden, ist E kleiner als 1, so liegt die Sicherung nicht mehr vor.

III. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Vorversuche mit E.coli 2380

Die ersten drei Versuche mit E.coli 2380 als spezifisches Antigen konnten aus verschiedenen Gründen nicht für eine Bewertung herangezogen werden. Bei dem ersten Versuch wurde die dem Antigen hinzugesetzte Harnstoffmenge irrtümlich zu niedrig angesetzt (20 mg Harnstoff auf 1 g Antigen). Die verschwindend geringe Menge Harnstoff hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis. Außerdem starb nach der Infektion keines der immunisierten Tiere, was in diesem Versuch noch für ein Zufall gehalten wurde.

Im zweiten Versuch wurden nun Harnstoff und Antigen zu gleichen Teilen gemischt (1 g Harnstoff auf 1 g Antigen). 5×10^{12} Keime entsprechen 1 g Antigen. Der nach der Infektion auftretende Impfschutz war aber wiederum hundertprozentig. Somit konnte auch nicht festgestellt werden, ob Harnstoff als Adjuvans wirksam ist.

Im dritten Versuch wurde nun die Antigenmenge reduziert, von 5×10^9 Keimen/ml im zweiten Versuch auf $1,1 \times 10^9$ Keime/ml, was aber zu keiner Senkung des Impfschutzes führte. Diese Ergebnisse sind umso erstaunlicher, als nämlich keine, wie man zunächst annehmen könnte, Abschwächung der Virulenz vorliegt, denn die Mortalität der unbehandelten Kontrolltiere lag im Durchschnitt bei 58,2 %. Das entspricht etwa der von STEFFEN (45) erreichten durchschnittlichen Mortalität von 56,0 %. Nahezu vollen Impfschutz erreichte auch KERNEN (21) in seinen Versuchen mit Impfstoffen aus Salmonellahybriden. Die Begründung dieses Phänomens muß zur Diskussion gestellt werden. Ein weiterer Befund in diesem Versuch war die größere Mortalität der Tiergruppe, die nur mit Harnstoff in aqua dest. behandelt wurde, im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe.

In Versuch Nr. 4 wurde die Antigenmenge weiterhin reduziert. Wir führten ihn als Dosisabhängigkeitstest durch mit Impfstoffkonzentrationen von 2×10^6 /ml, 2×10^7 /ml, 2×10^8 / und 2×10^9 Keimen/ml, versetzten diese mit den entsprechenden Mengen Harnstoff (Antigenmenge = Harnstoffmenge) und immunisierten jeweils 25 Mäuse. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 festgehalten. Auffällig ist wiederum, daß von den 50 Mäusen, die den Impfstoff in einer Konzentration von 2×10^9 Keimen/ml, mit oder ohne Harnstoff erhielten, keine einzige starb. Weiterhin zeigten sich erstmals Mortalitäten bei den Konzentrationen 2×10^7 /ml und 2×10^8 /ml, die endlich eine Beurteilung zuließen, ob von dem Harnstoffzusatz zum Antigen nun eine Beeinflussung der Wirksamkeit zu erwarten ist oder nicht. Die Mortalitätskurve dieses Versuches (Abb. 1) ließ eine Beeinflussung im positiven Sinne vermuten. Man sieht weiterhin, daß die Mortalität der Tiergruppe mit 10^6 Keimen /ml annähernd gleich der negativen Kontrollgruppe ist. Da hier kein Impfschutz zu erwarten war, verzichte-

ten wir auch auf die geringe Menge Harnstoff (0,2 mg), die dem Antigen hätte zugesetzt werden müssen.

2. Hauptversuche mit E.coli 2380

In den drei folgenden Großversuchen Nr. 5 - 7, für die insgesamt 1300 Mäuse gebraucht wurden, kamen zwei Impfstoffkonzentrationen zur Anwendung, um die Wirksamkeit des Harnstoffes besser verfolgen zu können. Wir immunisierten je 100 Mäuse mit Impfstoff der Konzentration 10^7 Keime/ml und Impfstoff der Konzentration 10^7 Keime/ml + Harnstoff, sowie 10^8 Keime/ml und 10^8 Keime/ml + Harnstoff und Harnstoffkontrolltiere, die nur mit Harnstoff in aqua dest. gefüttert wurden. Hier wählten wir die Harnstoffkonzentration, die sich aus der Antigenmenge des Impfstoffes der Konzentration 10^8 /ml ergab. Die Gesamtergebnisse der Versuche 4 - 7 sind in Abb. 2 zusammengefaßt. Eine deutliche Impfschutzverbesserung finden wir bei der Tiergruppe, die den Impfstoff in einer Konzentration von 10^8 Keimen/ml + Harnstoff erhalten hatte. Von den jeweils 275 Tieren starben nach der intraperitonealen Infektion 20 % der Gruppe, die den reinen Impfstoff erhielt, hingegen nur 9,1 % der Gruppe mit Harnstoffzusatz zum Impfstoff. Die beobachtete Differenz zur Tiergruppe, die den Impfstoff ohne Adjuvans erhielt, betrug 10,9 %, die zulässige Differenz 8,3, so daß sich eine Echtheit $E = 1,3$ ergibt und das Ergebnis somit als statistisch signifikant angesehen werden kann. Die höhere Mortalität der Harnstoffkontrollen läßt sich statistisch nicht sichern, die Echtheit E der aufgetretenen Differenz betrug nur 0,8. Ebenso läßt sich der bessere Impfschutz bei den Tieren einer Impfstoffkonzentration von

von 10^7 Keimen/ml + Harnstoff gegenüber der Gruppe Impfstoff ohne Harnstoffzusatz nicht sichern, denn die Echtheit E beträgt nur 0,29 (s. Tabelle 2).

3. Versuche mit S. enteritidis jena 317

In kleineren Versuchsreihen, die parallel zu den eben beschriebenen Versuchen durchgeführt wurden, testeten wir den Harnstoff mit dem Keim S. enteritidis jena 317. Als Versuchstiere dienten 300 "Falben" (Kreuzung zwischen NMRI-Maus und grauer Feldmaus). Ein Ergebnis ist als Beispiel graphisch in der Abb. 3 festgehalten. Hier zeigte sich keine Bestätigung aus den Versuchen E. coli 2380. Die Mortalität der Kontrollen liegt höher als die der Harnstoffkontrollen, der Zusatz des Adjuvans verschlechterte den Impfschutz sogar. Den Grund vermute ich in der nicht vorhandenen Reinerbigkeit der Tiere, so daß in zwei folgenden Versuchen mit insges. 400 Tieren der Keim S. enteritidis jena 317 mit Harnstoffzusatz an weiße NMRI-Mäuse getestet wurde. Aus der graphischen Zusammenfassung beider Versuche (Abb. 4) geht hervor, daß nun die Tendenz eines besseren Impfschutzes wieder auftrat. Die Mortalitäten der beiden annähernd gleich großen Vergleichsgruppen (99 und 100 Tiere) betrugen 32,2 % bei der Gruppe, die Impfstoff + Harnstoff erhielt und 45 % bei der Gruppe, die nur den reinen Impfstoff erhielt. Die beobachtete Differenz betrug 12,8 und die höchstzulässige Differenz 19, so daß sich eine Echtheit E von 0,67 ergab. Hier konnte, wahrscheinlich aufgrund des kleinen Tiermaterials, die statistische Sicherung nicht erbracht werden (s. Tabelle 3).

Abbildung 1

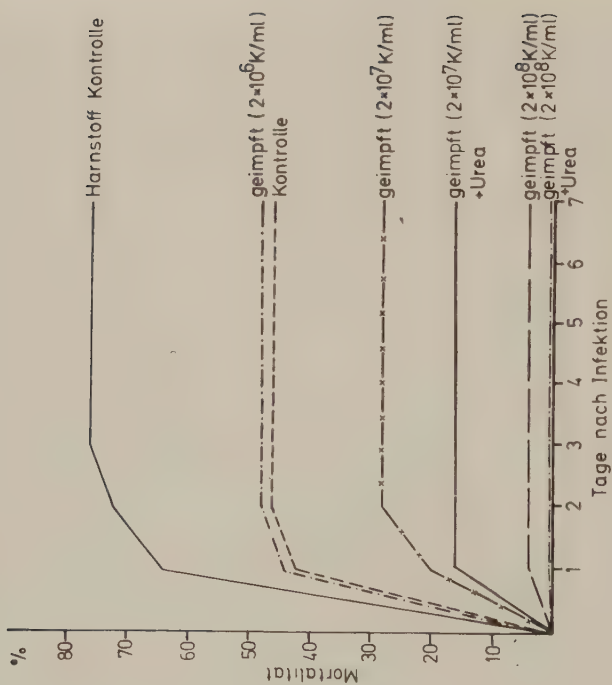


Tabelle 1 : Tabellarische Zusammenfassung der Versuche 4 - 7. Orale Immunisierung mit *E. coli* 2380 in den Konzentrationen 10^7 /ml und 10^8 /ml und intraperitoneale Infektion mit dem virulenten homologen Keim

	Vers. Nr.	Immunisiert mit 10^8 Keimen/ml				Immunisiert mit 10^7 Keimen/ml				Kontrollen		
		n	+	+	WI	n	+	+	WI	n	+	+
mit Harn- stoff	4	25	0	0	100	25	4	16	78,9	25	19	76
	5	50	4	8	89,7	50	20	40	48,7	50	39	78
	6	100	3	3	96,4	100	56	56	0	50	28	56
	7	100	18	18	72,7	100	47	47	28,7	50	33	66
	Sa.	275	25	9,1	86,6	275	127	46,1	32,2	175	119	68,0
ohne Harn- stoff	4	25	1	4	91,1	25	7	28	39,1	50	23	46
	5	50	20	40	41,1	50	31	62	8,8	50	34	68
	6	100	9	9	82,2	100	54	54	-	50	26	52
	7	100	25	25	56,8	100	43	43	25,8	50	29	58
	Sa.	275	55	20	64,3	275	135	49,8	11,1	200	112	56,0

Tabelle 2 : Statistische Sicherung der Versuche 4 - 7

Vergleich	n	% Mort.	WI	Db	D _Z	E
10 ⁷	275	49,8	11,7	6,2	12,4	0,5
Kontr.	200	56				
10 ⁸	275	20	64,3	36	12,4	2,9
Kontr.	200	56				
10 ⁷ +H	275	46,1	32,2	21,9	13,5	1,6
H-Ktr.	175	68				
10 ⁸ +H	275	9,1	86,6	58,9	13,5	4,3
H-Ktr.	175	68				
Kontr.	200	56	-	-	-	-
H-Kontr.	175	68				
10 ⁷	275	49,8	7,4	3,7	12,5	0,29
10 ⁷ +H	275	46,1				
10 ⁸	273	20	54,5	10,9	8,3	1,3
10 ⁸ +H	275	9,1				

Abbildung 2

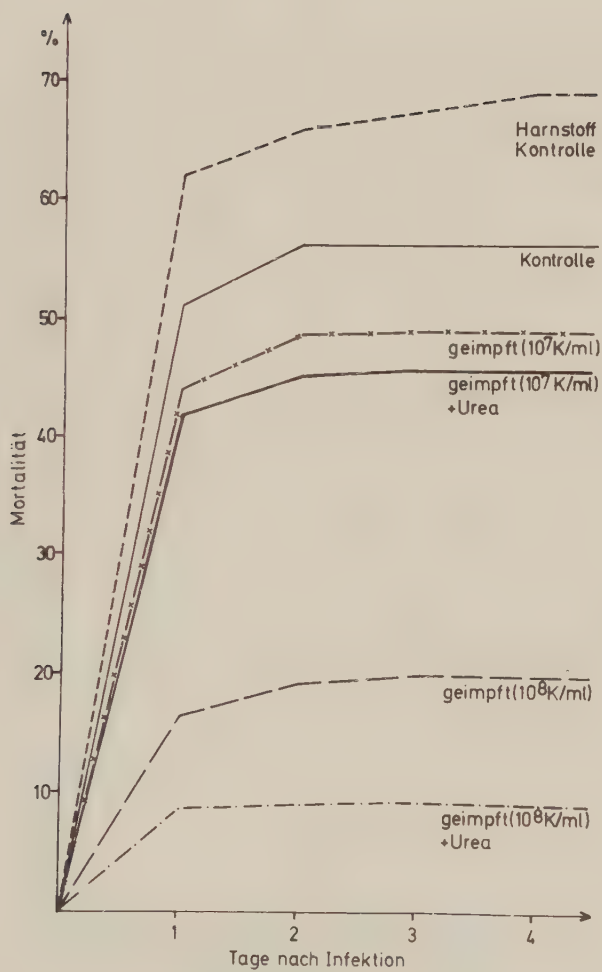


Abbildung 3

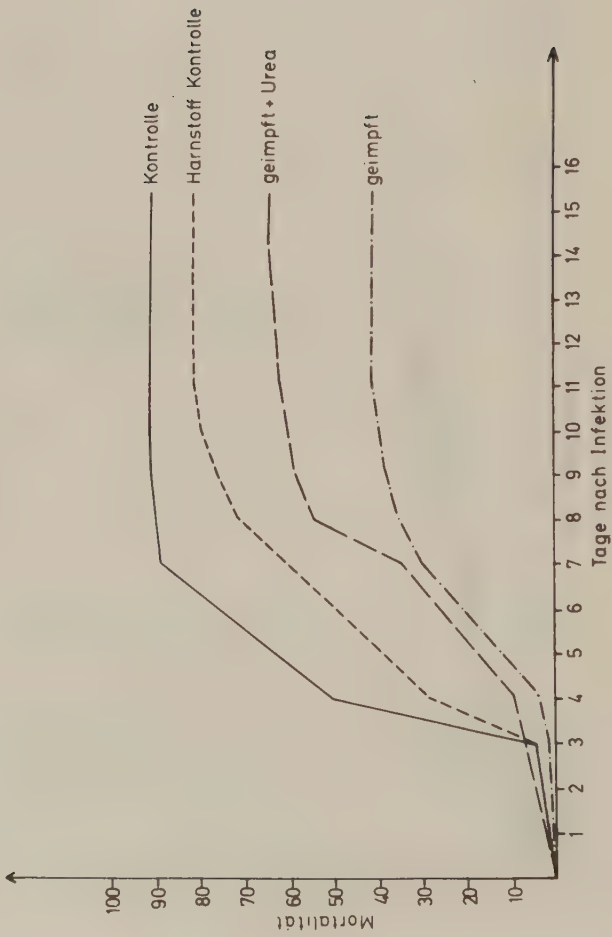
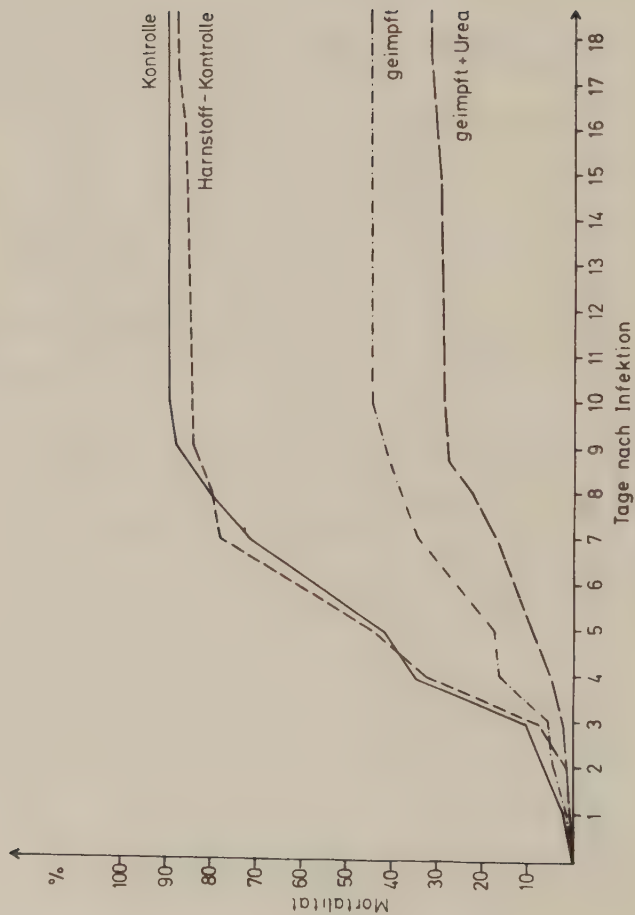


Tabelle 3 : Statistik der Versuche mit *S. enteritidis* jena 317
und der weißen NMRI-Maus

Vergleich	n	% Mort.	WI	Db	Dz	E
S.e.j. 317	100	45	50, 5	46	9, 1	5, 05
Kontr.	99	91				
S.e.j. 317 + H	99	32, 2	63	55, 8	19	2, 9
H-Kontr.	100	88				
Kontr.	99	91	3, 2	3	14, 5	0, 2
H-Kontr.	100	88				
S.e.j. 317 + H	99	32, 2	28, 4	12, 8	19	0, 67
S.e.j. 317	100	45				

Abbildung 4



IV. DISKUSSION

Die positiven Versuche 6 und 7, deren Ergebnisse sich statistisch sichern ließen, bestätigen die in der Literatur angegebene darmwand-sensibilisierende Wirkung von Harnstoff (4, 6). Ebenso spricht die zwar nicht gesicherte Tendenz der höheren Mortalität der negativen Harnstoffkontrollen für jene sensibilisierende Wirkung des Harnstoffs. Das setzt allerdings voraus, daß diese Wirkung auch noch längere Zeit nach der letzten Harnstoffgabe vorhanden ist, was anhand einer Zeitkinetik nachgewiesen werden müßte. Die von mir verwendete Harnstoffmenge entsprach jeweils der verabreichten Antigenmenge. Es bleibt weiteren Versuchen überlassen, in Dosisabhängigkeitsuntersuchungen herauszufinden, ob sich durch Änderung der Harnstoffmenge eine zusätzliche Verbesserung des Impfschutzes erzielen läßt; denn es ist nicht anzunehmen, daß die verwendeten Harnstoffmengen bereits Optimaldosen waren.

Um eine Erklärung für diese darmwand-sensibilisierende Wirkung des Harnstoffs zu finden, muß der mögliche Persorptionsmechanismus des Antigens kurz aufgezeigt werden. Nach VOLKHEIMER (49) versteht man unter Persorption das Phänomen des Übertritts fester, ungelöster Partikel im Mikrometergrößenbereich aus dem Darm in den Organismus. Dieser Vorgang wird auch nach seinem ersten Entdecker HERBST-Effekt genannt. HERBST beobachtete 1844 erstmals einzelne Stärkekörper im Blut und im Chylus eines Hundes, welchem er drei Stunden vorher eine Stärkesuspension eingebläst hatte (16). VOLKHEIMER und Mitarbeiter haben den Mechanismus für den Durchtritt durch die Epithelzellschicht in umfangreichen Versuchen rekonstruieren können und in zahlreichen Veröffentlichungen eine sichere wissenschaftliche Grundlage geschaffen. Die Lokalisation des Per-

sorptionsvorganges ist vorwiegend dort zu suchen, wo die Motorik der Muskularis mukosae am meisten ausgeprägt ist (Jejunum, Zottenpumpe) und wo einschichtiges Epithel die Schleimhaut des Verdauungstraktes deckt. Als Immigrationsort werden vor allem die Desquamationszonen des Epithels angesehen.

Da Harnstoff die Motilität des Darmtraktes eher hemmt als fördert (6), kann die angenommene verbesserte Persorption des Antigens nicht auf diesem Mechanismus beruhen. Bleiben also die Desquamationszonen des Darmepithels als möglicher Wirkungsort des Harnstoffs. In diesen Zonen, so VOLKHEIMER (50), ist der Kontakt der Epithelzellen untereinander und auch zur Basalmembran hin gelockert. Harnstoff ist in der Lage, Wasserstoffbrücken in Kollagen zu spalten (15), trägt also eventuell auf diese Weise zur weiteren Auflockerung der Desquamationszonen bei, zumal die Interzellulärsubstanz u. a. kollagene Fasern enthält. Der bessere Impfschutz wäre so durch eine vermehrte Persorption des Antigens zu erklären. Ob die höhere Mortalität der Harnstoffkontrollen auf einer länger dauernden allgemeinen Gewebsauflockerung des Magen-Darmkanals beruht, die auch bis auf das Peritoneum übergreift, welches somit für die intraperitoneale Infektion anfälliger wird, bleibt ungeklärt und müßte in speziellen Experimenten geklärt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Harnstoff als Adjuvans bei der oralen Impfung mit hintzeinaktivierten Bakterien wurde im aktiven Schutzversuch an der weißen NMRI-Maus geprüft. Als Testkeime dienten *E. coli* 2380 und *S. enteritidis* jena 317. Verschiedene Impfstoffkonzentrationen wurden verwendet, bei denen gleiche Gewichtsteile von Antigen und

Harnstoff gemischt wurden. Die spezifische Infektionsbelastung erfolgte intraperitoneal mit den virulenten homologen Keimen. Bei den Versuchen mit *E.coli* 2380 konnte eine Verbesserung des Impfschutzes statistisch gesichert nachgewiesen werden, während die Ergebnisse mit *S.enteritidis* jena 317 nicht eindeutig waren.

Ob eine Änderung der Harnstoffdosis die Ergebnisse verbessern könnte, bleibt weiteren Versuchen überlassen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BESREDKA, A. Die lokale Immunisierung
Verlag Johann Ambrosius Barth 1926

- 2 BESREDKA, A. Über lokale Immunisierung
Naturwissenschaften 17, 395 (1927)

- 3 BINAGHI, R.
 HALPERN, B.N.
 LIACOPOULOS, P.
 NEVU, T. Günstiger Effekt von Harnstoff auf
die passive Sensibilisierung von
isolierten glatten Muskeln in vitro
mit praezipitierenden Antikörpern.
Nature 184, 1805 (1959), aus Chem.
Zbl. 132, 3376 (1961)

- 4 BRAHMS, J.
 KAY, C.M. Die Rolle der durch Lösungsmittel
induzierten Konformationsänderungen
bei der enzymatischen ATP-ase-akti-
vität von cardialem Myosin A
J. biol. Chemistry 237, 3449-54 (1962),
aus Chem. Zbl. 134, 1129 (1963)

- 5 BROTZU, P. Un esperimento vaccinatione antitifica
per via orale
Policlinico sez. prat. 31, 867 (1924),
zit. nach Zbl.ges.Hyg. 9, 164 (1925)

- 6 CUPAVENCU, B.
 GROSU, L.
 BIRSAN, E.T. Unter-suchungen über die pharmakolo-
gische Wirksamkeit des Harnstoffes
auf Organe mit glatter Muskulatur
Acta biol. german. Berlin 6, 117-22
(1961), aus Chem. Zbl. 133, 15679 (1962)

- 7 DIETRICH, W. Resorption von Tetanusgift durch den Darm
Klin. Wschr. 1, 1160 (1922)
- 8 DUNGERN, E. v. Die Antikörper
Gustav Fischer Verlag, Jena 1903
- 9 EHRLICH, P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität
Dtsch. med. Wschr. 1891, 976 und 1218
- 10 zitiert nach FRÄNKEL, E. Über den Stand der peroralen Immunisierungsmethoden
Med. Klinik 5, 157 (1927)
- 11 FRÄNKEL, E. Versuche zur Frage der peroralen Immunisierung. Perorale Immunisierung bei der Maus gegen Paratyphus B
SCHULTZ, E. Zschr. f. Immunfshg. 53, 478 (1927)
- 12 GIORDANA, C. Wirkungen des Harnstoffes auf die physiologischen Systeme. 1. Mitteilung: Untersuchungen der Monoaminoxidaseaktivität
BLOOM, J. J. lab. clin. Med. 59, 396-400 (1962)
MERREL, J.P. aus Chem. Zbl. 136, 23-1177 (1965)
- 13 GOLDBERG, A.H. Steigerung der Lösungsgeschwindigkeit und der gastrointestinalen Absorption von Arzneimitteln durch Lösungen und eutektische Gemische
GIBALDI, M. J. Pharmac. Sci. 54, 1145-48 (1965)
KANIG, J.L. aus Chem. Zbl. 138, 19-1746 (1967)
- 14 GRABEN, N. Zur oralen Immunisierung von Mäusen mit S. t. m.-Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freund-schen-Adjuvans
Inaug. Diss. Berlin 1971

- 15 GUSTAVSON, K.H. Die Temperaturabhängigkeit von Wasserstoffbindungen in Kollagen durch Behandlung mit Harnstoff und deren Auswirkungen
J.Americ.Leather Chemist.Assoc. 55, 564-84 (1960), aus Chem.Zbl. 132, 12325 (1961)
- 16 HERBST, G. Das Lymphgefäß-System und seine Ver-
richtungen
Göttingen 1844, zitiert in Zschr.f. Gastroenterologie 2, 57-64 (1964)
- 17 HIDA, O.
TOYODA, H. Aktive Immunisierung per os
Saikinggaku-Zassi 1907, 138 aus Zbl.Bakt. I. Abt.Ref. 42, 418 (1909)
- 18 HIRSCH, S. Der Nutzen der prophylaktischen Immunisierung gegen Typhus
Dtsch.Med.Wschr. 1928, 1676
- 19 ISHIHARA
zitiert nach
MIZUTANI, A. Experimental Studies on the (per anal) immunization by bacterial vaccines (typhuy-dysentgroup)
Acta dermatol. 27, 15 (1936)
- 20 JENSEN-HOHN, J. Aktivität der Cholinesterase, allein und in Gegenwart von Inhibitoren, bei geringer Substratkonzentration
Acta pharmacol.toxicol.Kobenhavn 18, 379-397 (1961) aus Chem.Zbl. 134, 10519 (1963)
- 21 KERNEN, J. Versuche mit Impfstoffen aus Salmonellahybriden
Inaug.Diss. Berlin (in Vorbereitung)

- 22 KLÜCHLIN, S.
VIGODTSCHIKOFF, G. Experimentelle Bewertung der Cholera-
vakzinationsmethode per os
Zbl. Bakt. I. Orig. 94, 6 (1925)
- 23 zitiert nach
KLÜCHLIN, S. und Weitere experimentelle Untersuchungen
VIGODTSCHIKOFF, G. über die Enterovaccination gegen Cho-
lera und Dysenterie sowie Typhus
abdominalis
- 24 KOLLER, S. Neue graphische Tafeln zur Beurtei-
lung statistischer Zahlen
4. Auflage, Dr. Dietrich, Steinkopf-
verlag, Darmstadt 1969
- 25 LOEFFLER, F. Über Immunisierung per os
v. Leuthold-Gedenkschrift I, 247 (1906)
- 26 LUMIERE, A.
CHEVROTIER, J. Die Typhusschutzimpfung vom Magen-
Darmkanal aus
Münch. med. Wschr. 1914, 739
- 27 MATSOUKA
zitiert nach Chôsen Igakkai Zassi 20, 725 (1930)
MIZUTANI, A.
- 28 MAXWELL, E.S. Untersuchungen des Mechanismus, nach-
dem Steroidhormone Kaninchenleber-Al-
dehyddehydrogenase beeinflussen
J. biol. Chemistry 237, 1699-1703 (1962) ,
aus Chem. Zbl. 134, 959 (1963)
- 29 MIZUTANI, A. Experimental Studies on the (per anal)
immunization by bacterial vaccines
Acta Dermatol. Kyoto 27, 15-46 (1936)

- 30 NELSON, CH.
HUMMEL, J.P. Reversible Denaturierung von Pan-
kreasribonuclease durch Harnstoff
J.biol.Chemistry 237, 1567-74 (1962),
aus Chem.Zbl. 134, 12840 (1963)
- 31 NONEVIC, A. Versuch einer Enterovaccinierung
gegen Typhus abdominalis
Profil.med. 7. Beiheft 1928 (russisch),
zitiert nach Zbl.ges.Hyg. 19, 668 (1929)
- 32 zitiert nach
RAETTIG, H. Erfahrungen und vergleichende Betracht-
ungen über die Erfolge der parenteralen
peroralen Typhusschutzimpfung
Zschr.f.Immunfshg. 108, 165 (1950)
- 33 RAETTIG, H. Typhusimmunität und Schutzimpfung
Gustav Fischer Verlag, Jena 1952
- 34 RAETTIG, H. Tierversuche zur Wirkungsweise der
Aristolochiasäure (Tardolyt)
Zbl.Bakt. I Abt. Ref. 219, 179 (1969)
- 35 RAETTIG, H. Dimethylsulfoxide in experimental
Immunologie
8. Kapitel in Jacob v. Rosenbaums
"Dimethyl sulfoxide", Marcel Dekkar
inc. New York 1970
- 36 RAETTIG, H. Erste Mitteilung:
Orale Immunisierung mit nicht vermeh-
rungsfähigen Mikroorganismen oder ihren
Antigenen. Der Grundversuch zur Schutz-
impfung der Maus gegen eine Enteritis-
infektion
Zbl.Bakt. I. Abt. Orig. 193, 398-410 (1949)
- 37 zitiert nach
REITER, H. Versuche über perorale Immunisierung
Dtsch.med.Wschr. 52, 947 (1926)

- 38 REITER, H.
KUOWA, A. Versuche über perorale und percutane
Immunisierung
Kl. Wschr. 17, 744 (1926)
- 39 RÖMER, P. Experimentelle Untersuchungen über
Jequivitrolimmunität
Gräfes Archiv für Ophtalmologie 1901,
Bd. III
- 40 RÖMPS Chemielexikon
Franck'sche Verlagshandlung Stuttgart
1973
- 41 SCHMUDDE, R. Vergleichende orale, nasale und rectale
Impfung von Mäusen mit inaktivierten
S. t. murium Bakterien mit und ohne
Dimethylsulfoxidzugabe
Inaug. Diss. Berlin 1968
- 42 SHIGA, K. Über die aktive Immunisierung per os
Saikingaku-Zasshi 1908, 138
aus Zbl. Bakt. I. Ref. 42, 418 (1909)
- 43 SHIGONOBU, S. Über die Darmresorption von Natrium-
glucoronatisonicotinylhydrazon
Folia pharmacol. japon. 57, 250-64
(1961) aus Chem. Zbl. 135, 45 (1961)
- 44 STARZYNSKI Über den gegenwärtigen Stand der
zitiert nach oralen Immunisierungsmethoden
FRÄNKEL, E. Med. Klinik 5, 167 (1927)
- 45 STEFFEN, R. Zeitkinetik des Schutzes nach oraler
Impfung, nachgewiesen am Modell der
Dyspepsiecoli-Infektion der weißen Maus
Inaug. Diss. Berlin 1973

- 46 TRON, G. Intorno ad un grande esperimento di interovaccinatione antitiflica
Atti Sci. lombarda Soc.med. e biol. 17, 42 (1928)
- 47 TRON, G. Ulteriore contributo alla studio della enterovaccinatione antitifoparatifica
Boll.ist.Sieroter.Milan. 8, 445 (1929)
aus Zbl.Bakt. I. Abt. Ref. 96, 544 (1930)
- 48 VAILLANT, L. Note sur l'emploi du vaccin bilié de BESREDKA par la voie buccale dans quelques foyers épidémiques de fièvre typhoïde
Ann.Inst.Past. 36, 149 (1922)
- 49 VOLKHEIMER, G. "Persorption" in Gastroenterologie und Stoffwechsel
Bd. 2 Georg Thieme Verlag Stuttgart 1972
- 50 VOLKHEIMER, G.
WENDLANDT, H.
WAGEMANN, W.
et al. Beobachtungen zum Persorptionsmechanismus
Path. Microbiol. 31, 51-58 (1968)
- 51 WASSERMANN, A.
CITRON, J. Über die Bildungsstätte der Typhusantikörper
Zschr. f. Hyg. 50, 332 (1905)
- 52 YAMAHA, Y.
JYUNG, W.H.
WITTWERS, S.H.
BUKOVAE, M.J. Wirkung von Harnstoff auf die isolierte Cuticularmembran und Ionenaufnahme durch Blattzellen
Proc.Americ.Soc.horticult.Sci. 87, 429-32 (1965)
- 53 YAMAKAGE, I. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Resorption von Sulfanilamidpräparaten aus dem Verdauungstrakt
Folia pharmacol.japon. 55, 846-847 (1959) aus Chem.Zbl. 132, 10271 (1961)

Herrn Professor Dr. Raettig danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die großzügige Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Frau I. Schubert, die an der Durchführung der Versuche maßgeblich beteiligt war.

Fräulein C. Jaschinski danke ich für die stets freundliche Hilfe.

Diese Arbeit wurde zum Teil aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert, der ich hiermit ebenfalls meinen Dank ausspreche.

LEBENS LAUF

Am 24. März 1946 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Heinz Brachlow und seiner Ehefrau Maria, geborene Barowski, in Freiheit, Krs. Osterode/Harz, geboren.

Von 1953 bis 1959 besuchte ich die Grundschule in Berlin, ab 1959 das Paulsen Gymnasium, an dem ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester begann ich mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin und legte im August 1973 das Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich zum Teil in Berlin und in der Bundesrepublik.

Die Approbation erhielt ich im September 1975.

Zur Zeit bin Ich Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Dr. Otto Geßler Krankenhauses in Lindenberg/Allgäu.

